

# 連続培養における口腔嫌気性菌の発育に関する研究 ： 特にpHと酸化還元電位の影響について

|     |   |
|-----|---|
| 著者  | 川? 傳男   |
| 発行年 | 1987-06-30  |
| URL | <a href="http://hdl.handle.net/10422/1652">http://hdl.handle.net/10422/1652</a> |

|             |   |
|-------------|---|
| 氏名・(本籍)     | かわ さき つぐ お<br>川 崎 傳 男 (滋賀県)                       |
| 学 位 の 種 類   | 医学博士  |
| 学 位 記 番 号   | 論医博第25号   |
| 学位授与の要件     | 学位規則第5条第2項該当                                      |
| 学位授与年月日     | 昭和62年6月30日  |
| 学 位 論 文 題 目 | 連続培養における口腔嫌気性菌の発育に関する研究<br>—特に pH と酸化還元電位の影響について— |

|         |       |         |
|---------|-------|---------|
| 審 査 委 員 | 主査 教授 | 尾 崎 良 克 |
|         | 副査 教授 | 北 里 宏   |
|         | 副査 教授 | 野 崎 光 洋 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔緒 論〕

う蝕や歯周疾患をはじめ、顎、口腔外科領域の感染症の発症と進展には歯垢内に生息する口腔常在菌が重要な役割を果たすと考えられる。*Streptococcus mutans* や *Actinomyces viscosus* などは歯に好んで定着し、う蝕の原因菌の一つに数えられている。一方、歯周ポケット内には、*Fusobacterium*, *Bacteroides* などの多種の偏性嫌気性菌が多く存在することが明らかになり、更に、口腔領域の感染症は偏性嫌気性菌を含む混合感染であることが多いと報告されている。しかし、口腔細菌相互の関係については不明な点が多い。今回、口腔常在菌相互の共生と拮抗を研究することを目的として、簡易嫌気性連続培養装置を試作し、口腔常在菌の相互関係について検討した結果、若干の知見を得た。

### 〔実験材料、方法および成績〕

- 1) 実験装置：本研究に使用した簡易連続培養装置は牛嶋の報告を参考に改良して用いた。
- 2) 供試菌株：*Streptococcus mutans* 6715 (*S. mutans*), *Actinomyces viscosus* ATCC 19246 (*A. viscosus*), *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 (*F. nucleatum*), *Bacteroides melaninogenicus* ATCC 25845 (*B. melaninogenicus*) を用いた。
- 3) 使用培地：BHI を基礎培地とし、グルコース、L-シスチン塩酸塩、チオグリコール酸ナトリウム、ヘミン、を添加して用いた。なお、*B. melaninogenicus* には、これに酵母抽出物、ビタミンK<sub>3</sub>、微量の寒天を添加して用いた。
- 4) Eh と pH の測定：Eh は白金酸化還元電位電極、pH は pH 電極によって測定した。
- 5) 単一菌の連続培養：前述の培地で各菌株を前培養した後、 $1 \times 10^6$  cells/ml になるように培養槽内に接種し、37℃で6日間連続培養した。なお、培地の流速は約 5 ml/h とし

た。接種直後から培養終了まで24時間毎に colony forming units / ml (CFU)、pH および Eh を測定した。なお、pH が Eh におよぼす影響を排除するため pH を 6.8~7.0 に制御したものについても同様に測定した。

- 6) 2種類の菌の連続培養: *S. mutans* を定常状態にした後に、*A. viscosus*, *F. nucleatum*, *B. melaninogenicus* を  $5 \times 10^6$  cells/ml になるように接種し、CFU, pH, Eh を24時間毎に測定した。その逆についても検討した。また、同様に、pH を制御したものについても測定した。

実験成績: 試作した簡易連続培養装置を、コントロールとして、菌を接種しないで、作動させた場合、培養槽内の培養液の Eh は直後の -308 mV から6日目には -276 mV であった。

- 1) 単一菌の連続培養: 偏性嫌気性菌である *B. melaninogenicus*, *F. nucleatum* の連続培養が可能であった。*S. mutans*, *A. viscosus*, *F. nucleatum*, *B. melaninogenicus* の CFU はそれぞれ約  $1 \times 10^8$ 、約  $3 \times 10^9$ 、約  $5 \times 10^8$ 、約  $3 \times 10^{10}$ 、で定常状態に達し、pH はそれぞれ 4.8、5.5、5.8、6.1 であった。Eh は6日目には -139 mV、-210 mV、-424 mV、-377 mV を示した。pH を制御した場合には、CFU はそれぞれ 約  $5 \times 10^8$ 、約  $3 \times 10^9$ 、約  $1 \times 10^9$ 、約  $3 \times 10^{10}$  で定常状態になり、Eh は、6日目には、-267 mV、-271 mV、-453 mV、-415 mV を示した。

- 2) 2種類の菌の連続培養: pH 非制御下においては *S. mutans* は *F. nucleatum* や *B. melaninogenicus* を著明に抑制した。*A. viscosus* は *S. mutans* によって抑制されなかった。一方、pH 制御下においては *F. nucleatum*, *B. melaninogenicus* は *S. mutans* によって抑制を受けなかった。

#### [考 察]

本装置は、偏性嫌気性菌を含む口腔常在菌相互の関係を研究する上で有用であった。*F. nucleatum*, *B. melaninogenicus* は増殖に伴って、培養液の Eh を約 100~150 mV 低下させた。pH 非制御下では、*F. nucleatum*, *B. melaninogenicus* は *S. mutans* によって著明に抑制され、*A. viscosus* は抑制されなかった。これはそれぞれの菌株の耐酸性の相違によると考えられる。*S. mutans* の他の菌に対する抗菌因子はバクテリオシン、 $H_2O_2$  等が考えられるが、Mashimo らの報告や本研究における細菌の発育に対する pH の影響を考え合わせると、*S. mutans* の代謝産物である乳酸が他の菌に対する発育抑制因子であると推測された。

#### [結 論]

口腔常在菌相互の共生と拮抗を検討する為、簡易連続培養装置を試作し、*S. mutans*, *A. viscosus*, *F. nucleatum*, *B. melaninogenicus* を連続培養した結果、次の結論を得た。

- 1) 本装置は *F. nucleatum*, *B. melaninogenicus* の連続培養が可能であった。
- 2) *F. nucleatum*, *B. melaninogenicus* は増殖に伴って、培養液の Eh を約 100~150 mV 低下させた。
- 3) *A. viscosus*, *S. mutans* は増殖に伴って、pH 非制御下では、培養液の Eh を上昇させ、pH 制御下では、殆ど影響しなかった。
- 4) *F. nucleatum*, *B. melaninogenicus* の発育は *S. mutans* によって著明に抑制された。

しかし、連続培養中の培養液のpHを抑制した場合には制御されなかった。

5) *S. mutans* と *A. viscosus* は共生した。

### 学位論文審査の結果の要旨

本研究は、齲蝕や歯周疾患の発症や進展に大きな役割を果たすと考えられている多数の口腔内常在細菌、特に偏性嫌気性菌の複雑な相互関係を著者らが試作した簡易嫌気性連続培養装置による *in vitro* の系を用い、各菌種にとって重要な培養環境条件となる水素イオン濃度(pH)と酸化還元電位(Eh)の変動を指標に検討したものである。

その結果、(1) *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) 及び *Actinomyces viscosus* (*A. viscosus*) は、pH 制御のもとで発育させた時、Ehに大きな影響を与えず、pH非制御下では、pHの著明な低下を伴うEhの上昇が認められること(2) *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) 及び *Bacteroides melaninogenicus* (*B. melaninogenicus*) の培養では、pHの制御、非制御に関係なく、Ehの低下がみられること(3) *F. nucleatum* または *B. melaninogenicus* と *S. mutans* との混合培養に於て、*S. mutans* の発育は、pH制御のもとでは他の両菌種の発育を抑制しないにもかかわらず、pH非制御のもとでは、それらの菌種の著明な発育抑制がpHの著しい低下を伴って認められること(4) *S. mutans* と *A. viscosus* との混合培養では、相互に影響を受けることなく発育し共生することなどを明らかにした。

これらの成績から、それぞれの菌種には耐酸性に相違があり、それが混合培養における拮抗・共生の関係を支配するものであらうと考え、特に *S. mutans* の *F. nucleatum* または *B. melaninogenicus* に対する発育抑制は *S. mutans* の代謝産物の一つである乳酸によるpHの低下に基づくものと推論している。

本研究の特徴は、偏性嫌気性菌の従来の連続培養法に改良を加え、任意の時点におけるpH及びEhの測定を可能とし、菌相互の拮抗・共生の關係に、従来主として検討されてきた栄養代謝や抗菌因子の産生によること以外にpH及びEhの変動が大きく関わっていることを明らかにした点である。さらに、口腔内常在細菌を用いて行ったこの研究は、口腔内における常在菌叢の成立機序に一つの示唆を与え、これらの菌の感染が関わっていると考えられる齲蝕や歯周疾患の成因に新しい手がかりを与えたものとして評価される。

以上により本研究論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。